文章编号:1000-5404(2012)23-2357-03

论著

蜕皮甾酮对大鼠脑组织自由基损伤的保护作用

高诗豪,唐政恒,陈图南,李 飞,单佑安,冯 华 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 观察蜕皮甾酮(ecdysterone, EDS)对大鼠脑损伤的治疗作用。**方法** SD雄性大鼠120只,按随机数字表法分6组,每组20只。采用Feeney法自由落体打击鼠脑造模。假手术组动物只开颅,不打击;治疗组:分别采用4、8、16 mg/kg的EDS腹腔注射模型动物;阴性治疗对照组:模型动物腹腔注射生理盐水;阳性治疗对照组:模型动物腹腔注射3 mg/kg依达拉奉。伤后7 d计算各组动物死亡率;检测各组动物脑组织含水量及丙二醛(MDA)、羟自由基能力及超(过)氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等。HE染色观测各组大鼠脑组织海马病变情况。**结果** 伤后7 d,16 mg/kg EDS治疗组的死亡率、脑组织含水量MDA与羟自由基含量较阴性治疗对照组明显降低($P<0.05$),SOD活性显著升高($P<0.01$),脑细胞损害明显减轻,大鼠海马CA1区正常神经元数量明显优于阴性治疗组($P<0.01$)。**结论** 蜕皮甾酮对脑损伤具有保护治疗作用。

[关键词] 蜕皮甾酮;脑损伤;死亡率;脑水肿;自由基
[中图法分类号] R362; R651.15; R977 [文献标志码] A

Ecdysterone protects brain injury against free radical in rats

Gao Shihao, Tang Zhengheng, Chen Tunan, Li Fei, Shan You'an, Feng Hua (Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of ecdysterone (EDS) on traumatic brain injury (TBI) in rats. **Methods** A total of 120 male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into 6 groups, sham-operation group, TBI group, edaravone treatment group and EDS treatment groups. Modified Feeney's method was used to establish the rat model of experimental TBI with an impact of a weight of 30 g from 20 cm after craniotomy. Rats of EDS treatment groups were given EDS at 4, 8, and 16 mg/kg *via* peritoneal injection for 7 d. The other 3 groups were treated with normal saline or edaravone (3 mg/kg). The animal death rate was calculated, and the changes of the brain water content, malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in brain tissue were calculated and measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of brain hippocampus tissue. **Results** EDS (16 mg/kg) resulted in significant decreases in the death rate, brain water content, and MDA content ($P<0.05$), and an obvious increase in SOD content ($P<0.01$) compared with TBI group. EDS (16 mg/kg) also resulted in lesser damage in the brain cells, with the pyramidal cells number significantly higher than TBI group ($P<0.01$). **Conclusion** EDS exerts therapeutic effect on TBI through inhibiting free radical damage and brain edema.

[**Key words**] ecdysterone; traumatic brain injury; death rate; brain edema; free radical

Corresponding author: Feng Hua, E-mail: fenghua8888@yahoo.com.cn

蜕皮甾酮(ecdysterone, EDS)是昆虫蜕皮活性的天然甾体化合物,富含于动、植物,易于获取,是中药材牛膝、漏芦等的活性成分。它能影响糖及脂类代谢,促进核酸、蛋白质合成,降低毛细血管通透性、改善微循环、调节血管舒缩,抗脂质体过氧化、保护细胞、增强机体免疫等,对中枢神经系统具良好的药理活性[1-2]。因其药理活性强,且毒、副作用小而备受关注[3]。颅脑外伤继发性脑水肿[4]和氧化应激[5]是其病理生理的重要环节,蜕皮甾酮可能干预这些环节以保护受伤组织,降低病死率。本研究采用EDS腹腔注射治疗大鼠脑损伤,观测其对脑损伤的治疗效果并探讨其部分机制。

1 材料与方法

1.1 主要药品及试剂

97.0%蜕皮甾酮单体(上海同田生物技术有限公司);依达拉奉注射液(江苏省南京先声东元制药有限公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘

[通信作者] 冯 华,E-mail:fenghua8888@yahoo.com.cn

肽过氧物酶(GSH-Px)及羟自由基检测试剂盒(江苏省南京建成生物工程研究所)。

1.2 动物分组、脑损伤模型复制、处理与观测

清洁级2~3月龄,健康SD雄性大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)120只,体质量200~250 g,按随机数字表法分为6组,每组20只。

参照Feeney等[6]的方法建立脑损伤模型,以3%戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,头顶脱毛、消毒后固定于立体定向仪上,正中切口开颅,以牙科钻于冠状缝后3 mm与矢状缝右侧3 mm交会处钻孔,扩大骨窗至6 mm×6 mm(前至冠状缝,左界为矢状缝右旁2 mm),保持硬膜完整;将30 g的圆柱打击棒(直径4.5 mm)垂直固定于立体定向仪的套管内,自20 cm高度释放,正中打击钻孔处,明胶海绵局部止血,无活动性出血后间断缝合头皮。假手术组:动物只开骨窗,不行打击处理;治疗组(3组):采用不同浓度(4、8、16 mg/kg)的EDS分别腹腔注射模型动物;阴性治疗对照组:模型动物腹腔注射生理盐水;阳性治疗对照组:模型动物腹腔注射依达拉奉(3 mg/kg)。

伤后7 d,参照文献[7]计算各组动物死亡率,死亡率=(死亡动物数/手术动物数)×100%;干湿法测脑组织含水量,脑含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%;速取脑损伤组织,制作10%匀浆液,离心后取上清,行MDA、SOD等检测,严格按试剂盒操作说明进行。同时解剖各动物脑,大体观察其损伤、出血等情况。取部分动物全脑,常规病理石蜡切片(4 μm),HE染色,光镜观察各组病变情况,以相同光亮度用C5型网格目镜尺在400倍下计数海马CA1区锥体细胞层0.25 mm^2范围内细胞膜、核膜完整,细胞核无固缩和溶解的正常神经元数。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 伤后动物一般情况和大体观察

伤后动物正常饲养,除假手术组外,各组大鼠致伤后均出现不同程度的神经功能障碍,动物活动、进食少,左侧肢运动失常、行走时向左侧倾倒,颈支撑头困难,个别大鼠出现昏迷状。

2.2 动物死亡率计算

伤后7 d,各组动物死亡情况见表1。结果显示,阴性治疗对照组死亡率为30%,与既往数据(35%左右)接近,16 mg/kg EDS治疗组死亡率较阴性治疗对照组明显降低($P<0.05$)。

表1 各组大鼠死亡情况比较

组别	例数	存活动物数	死亡动物数	死亡率(%)
阴性治疗对照组	20	14	6	30
阳性治疗对照组	20	18	2	10
4 mg/kg EDS治疗组	20	18	2	10
8 mg/kg EDS治疗组	20	18	2	10
16 mg/kg EDS治疗组	20	19	1	5[a]

a:$P<0.05$,与阴性治疗对照组比较

2.3 伤后动物脑组织含水量检测

伤后7 d,可见打击侧脑组织较对侧明显水肿,体积增大。各组动物脑组织含水量检测结果见表2,假手术组脑组织含水量显著低于其余各组($P<0.01$);16 mg/kg EDS治疗组较阴性治疗对照组明显降低($P<0.05$);阳性治疗对照组脑组织含水量较阴性治疗对照组明显降低($P<0.05$),略高于16 mg/kg EDS治疗组,但二者无统计学差别。

表2 各组大鼠脑组织含水量比较[$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	n	脑组织含水量
假手术组	5	76.80±0.18
阴性治疗对照组	5	82.52±0.29[b]
阳性治疗对照组	5	79.00±1.09[ab]
4 mg/kg EDS治疗组	5	80.86±1.24[b]
8 mg/kg EDS治疗组	5	80.19±2.05[b]
16 mg/kg EDS治疗组	5	78.87±1.07[ab]

a:$P<0.05$,与阴性治疗对照组比较;b:$P<0.01$,与假手术组比较

2.4 伤后动物脑组织匀浆生化指标测定

伤后7 d,各组动物脑组织匀浆生化指标检测结果见表3。与阴性治疗对照组比较,不同剂量的EDS治疗组MDA含量与羟自由基能力显著降低($P<0.05$),SOD活性显著升高($P<0.01$),且MDA降低与SOD升高趋势均呈剂量依赖性。与阳性治疗对照及假手术组比较,16 mg/kg EDS治疗组的该3项指标均无明显差别($P>0.05$)。提示16 mg/kg EDS对脑损伤具明显保护作用。

表3 各组大鼠脑组织MDA含量、SOD活性和羟自由基能力比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDA(mmol/L)	SOD(NU/ml)	羟自由基能力(U/mg)
假手术组	5	5.57±0.52[b]	128.93±3.54[b]	124.63±3.35[b]
阴性治疗对照组	5	14.82±1.63	59.67±3.29	917.13±7.29
阳性治疗对照组	5	6.80±1.88[b]	117.93±10.03[b]	177.17±3.69[b]
4 mg/kg EDS治疗组	5	12.69±4.67	68.28±7.24	369.81±2.86[a]
8 mg/kg EDS治疗组	5	9.76±3.21[a]	85.98±12.12[b]	324.23±9.34[a]
16 mg/kg EDS治疗组	5	8.67±2.94[a]	113.03±11.64[b]	172.93±2.98[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与阴性治疗对照组比较

2.5 病理学观察

伤后7 d,HE染色观察大鼠海马CA1区组织显示,低倍镜下见各组锥体细胞带排列整齐规则,但阴性治疗对照组较其他组变薄,且细胞排列变疏松(图1)。高倍镜下见阴性治疗对照组与其他组比较,锥体细胞数量少、排列疏松、细胞间隙宽,部分锥体细胞胞体缩小、细胞核固缩、染色较深,呈现凋亡细胞特有形态学特征(图1)。阳性治疗对照组及16 mg/kg EDS治疗组的锥体细胞形态和数量与假手术组更接近,明显优于阴性治疗对照组($P<0.01$)(表4)。

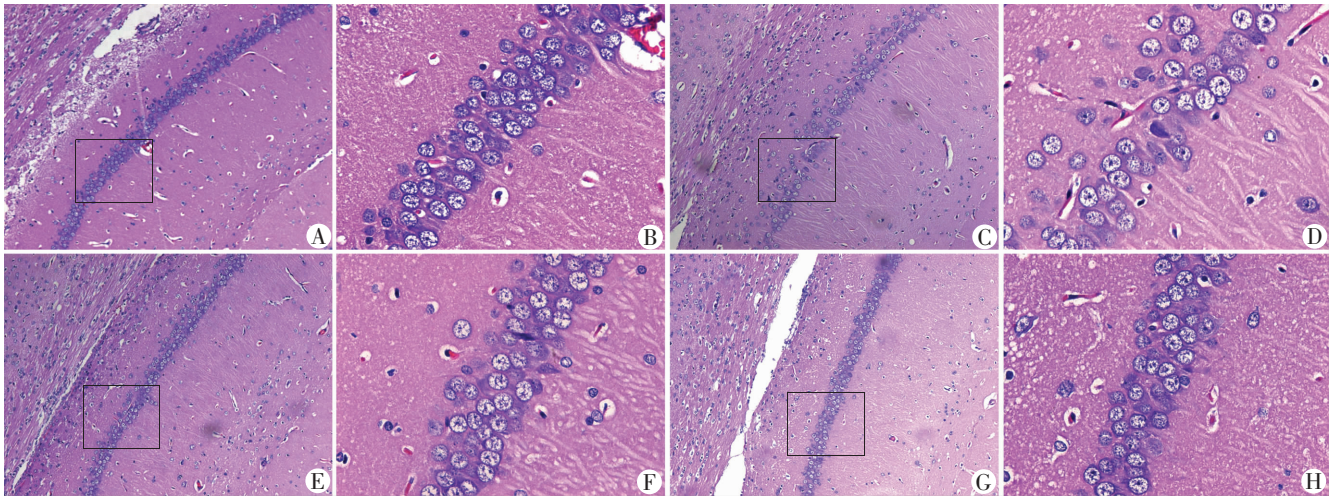
表4 各组大鼠海马CA1区正常神经元计数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	正常神经元数量
假手术组	5	98.33±5.13[a]
阴性治疗对照组	5	26.00±2.65
阳性治疗对照组	5	62.33±2.08[ab]
16 mg/kg EDS治疗组	5	57.00±5.57[ab]

a:$P<0.01$,与阴性治疗对照组比较;b:$P<0.01$,与假手术组比较

3 讨论

颅脑外伤致一系列病理、生理改变,如能量代谢失常、钙超载、自由基侵蚀、微循环障碍等所致的脑组织水肿是患者死亡的关键原因之一[8]。本结果显示,16 mg/kg EDS治疗组可使脑损伤大鼠伤后7 d的死亡率显著降低,脑组织含水量降低至78.87%。HE染色观



A:假手术组(×100);B:A 图的局部放大(×400);C:阴性治疗对照组(×100);D:C 图的局部放大(×400);E:16 mg/kg EDS 治疗组(×100);F:E 图的局部放大(×400);G:阳性治疗对照组(×100);H:G 图的局部放大(×400)

图 1 HE 染色观察各组大鼠海马组织病理学变化

察显示,EDS 治疗后能明显改善海马组织的充血与水肿,使锥体细胞凋亡程度明显减轻。提示适量的 EDS 治疗能减轻脑组织的充血、水肿,降低死亡率,缓解颅脑外伤所致的脑细胞损害。

脑损伤后产生大量的自由基使细胞功能受损,引起其坏死或凋亡,同时直接的脂质过氧化破坏改变血管收缩能力使脑组织损伤更加严重[9]。大量研究证实,自由基清除剂可有效保护脑组织损伤。EDS 分子结构中的羟基和氨基团能削弱自由基反应[10],是良好的自由基清除剂。EDS 清除自由基保护组织的作用,在心血管[11]、局灶性脑梗死模型[12]等方面已经被证实。本结果显示,EDS 治疗组的 MDA 含量及羟自由基能力较对照组明显降低,SOD 活性明显升高,且此变化呈"剂量-依赖性"。由此提示,EDS 减轻脑组织的充血、水肿,降低死亡率的可能机制之一是通过拮抗自由基损伤所致。

本实验从形态学、生物化学等方面较为系统地证明了 EDS 对大鼠脑损伤有明确的治疗作用。EDS 药理作用广泛,能有效抑制缺血缺氧所致的内皮细胞凋亡[13],促进 VEGF 表达与血管生成,改善局部微循环灌注[14]。EDS 还可增加脑组织一氧化氮(NO)的代谢产物 NO_2^-/NO_3^-,使血管扩张,增加血流量[15],以促使渗出物的吸收与消散,这可能是 EDS 减轻脑组织的充血、水肿,降低死亡率的又一机制。

参考文献:

[1] Hu J, Zhao T Z, Chu W H, *et al*. Protective effects of 20-hydroxyecdysone on CoCl(2)-induced cell injury in PC12 cells[J]. J Cell Biochem, 2010, 111(6): 1512-1521.

[2] Zukowski M, Zeilinger A, Horne M A, *et al*. "Event-ready-detectors" Bell experiment *via* entanglement swapping[J]. Phys Rev Lett, 1993, 71(26): 4287-4290.

[3] 陈志, 冯华, 朱刚, 等. 蜕皮甾酮对实验性蛛网膜下腔出血后兔脑微血管内皮细胞与中性粒细胞间黏附的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2004, 6(4): 270-272.

[4] Greve M W, Zink B J. Pathophysiology of traumatic brain injury[J]. Mt Sinai J Med, 2009, 76(2): 97-104.

[5] Petronilho F, Feier G, de-Souza B, *et al*. Oxidative stress in brain according to traumatic brain injury intensity[J]. J Surg Res, 2010, 164(2): 316-320.

[6] Feeney D M, Boyeson M G, Linn R T, *et al*. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res, 1981, 211(1): 67-77.

[7] 李梅, 吴国材, 李飞, 等. 脾脏切除对实验性脑损伤大鼠生存率及血液、脑组织中 IL-1β 含量的影响[J]. 创伤外科杂志, 2009, 11(4): 302-305.

[8] Eghwrudjakpor P O, Allison A B. Oxidative stress following traumatic brain injury: enhancement of endogenous antioxidant defense systems and the promise of improved outcome[J]. Niger J Med, 2010, 19(1): 14-21.

[9] Markland N, Clansen F, Lewander T. Monitoring of reactive oxygen species production after traumatic brain injury in rats with microdialysis and the 4-hydroxybenzoic acid trapping method[J]. J Neurotrauma, 2001, 18(11): 1217-1227.

[10] Osinskaia L F, Saad L M, Kholodova IuD. Antiradical properties and antioxidant activity of ecdysterone[J]. Ukr Biokhim Zh, 1992, 64(1): 114-117.

[11] 胡友军, 吴旭, 洪波, 等. 蜕皮激素减轻缺血性心肌损伤的作用及机制[J]. 中华临床医药, 2002, 3(9): 24-26.

[12] 罗春霞, 张映琦, 迟路湘, 等. 蜕皮甾酮对大鼠局灶性脑梗死的保护作用及机制初讨[J]. 西南国防医药, 2009, 19(2): 176-178.

[13] 晋军, 黄岚, 祝善俊, 等. 蜕皮甾酮对内皮细胞凋亡保护作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(5): 546-548.

[14] 罗春霞, 陈康宁, 冯华, 等. 蜕皮甾酮对局灶性脑缺血大鼠血管生成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 581-584.

[15] 吴旭, 姚一, 卓豫. 蜕皮甾酮对急性脑损伤的保护作用及机制探讨[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(7): 454-457.

(**收稿**:2012-09-10;**修回**:2012-10-23)

(编辑 王 红)